

⑫ 公表特許公報 (A)

昭63-503007

⑬ 公表 昭和63年(1988)11月2日

⑭ Int. Cl. ⁴	⑮ 発明の名称	⑯ 特 願	⑰ 出 願	⑱ 特 許 求	⑲ 予備審査請求	⑳ 未請求	㉑ 未請求	㉒ 部 門 (区 分)	㉓ 6 (1)
G 01 N 33/58 C 07 H 21/04 C 12 Q 1/58 G 01 N 33/50	DNAプローブおよびその調製方法	昭62-500537	昭61(1986)12月26日						
				A-8305-2G	6807-4B 6807-4B F-8305-2G				(全 8 頁)

⑭ 発明の名称 DNAプローブおよびその調製方法

⑯ 特 願 昭62-500537

⑰ 出 願 昭61(1986)12月26日

⑱ 翻訳文提出日 昭62(1987)8月27日

⑲ 国 際 出 願 PCT/JP86/00682

⑳ 国際公開番号 WO87/04165

㉑ 国際公開日 昭62(1987)7月16日

⑭ 発 明 者 村 尾 康 雄

神奈川県横浜市津西1-31-17

⑭ 発 明 者 保 坂 健 太 郎

東京都三鷹市深大寺3865

⑭ 発 明 者 三 浦 久 美 子

神奈川県藤沢市大塚3-5-18

⑭ 出 願 人 東 レ 株 式 会 社

東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

⑭ 代 理 人 丹 理 士 谷 川 英 次 郎

⑭ 指 定 国 AT (広域特許), BE (広域特許), CH (広域特許), DE (広域特許), FR (広域特許), GB (広域特許), IT (広域特許), JP, LU (広域特許), NL (広域特許), SE (広域特許)

要 求 の 範 囲

1. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片と、非放射活性マーカー又は非放射活性マーカーを結合することができる官能基を有する二重鎖DNA断片とを含むDNAプローブ。

2. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖断片以外の領域が実質的に全て二重鎖であることを特徴とする請求の範囲第1項記載のDNAプローブ。

3. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片以外の領域がバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項記載のDNAプローブ。

4. バクテリオファージはM13である請求の範囲第3項記載のDNAプローブ。

5. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供する工程と、第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の部分に相補的な領域を有し、非放射活性マーカー又は非放射活性マーカーを結合することができる官能基を有する第2の単鎖DNAを第1の単鎖DNAとハイブリダイズさせる工程とを含むDNAプローブの調製方法。

6. 第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域はバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第5項

記載の方法。

7. バクテリオファージはM13であることを特徴とする請求の範囲第5項記載の方法。

8. 第3の単鎖DNAは非放射活性マーカーを結合することができる官能基を有し、ハイブリダイゼーション後に非放射活性マーカーを結合能基に結合する工程をさらに含むことを特徴とする請求の範囲第5項ないし第7項のいずれか1項に記載の方法。

9. 検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供する工程と、第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNA断片以外の領域上に、該領域を保護して用い、非放射活性マーカー又は非放射活性マーカーを結合することができる官能基を有するヌクレオチドを用いて相補DNAを形成する工程を含むDNAプローブの調製方法。

10. 第1の単鎖DNAの、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域はバクテリオファージ由来であることを特徴とする請求の範囲第9項記載の方法。

11. バクテリオファージはM13であることを特徴とする請求の範囲第10項記載の方法。

12. 第2の単鎖DNAは非放射活性マーカーを結合することができる官能基を有し、相補DNA形成後に非放射活性マーカーを結合能基に結合する工程をさらに含むこと

を特標とする請求の範囲第9項ないし第11項のいずれか1項に記載の方法。

明 示
DNAプロローブ及びその調製方法

発明の分野

この発明は、ウイルス、病原体又は動物等によって感染するDNA又はRNAを検出し又は定量するために用いられるDNAプロローブに関する。

背景技術

DNA又はRNAの塩基配列は、そのDNA又はRNAを含むウイルス又は生物にとって固有のものである。DNAやRNAはそれに相補的なDNA又はRNAとハイブリダイズして二重鎖を形成する。従って、この性質を利用してDNAやRNAを検出し又は定量するためにDNAプロローブが用いられている。

従来、DNAプロローブは、検出しようとするウイルス、病原体又は動物のDNA又はRNAに相補的なDNA又はRNAをラベルで直接標識することによって調製されている。最も高感度の標識は放射線標識である。しかしながら、放射線標識感度が高いほど半減期が短く、取扱いが危険であり、特殊な高感度設備が必要であるという欠点を有する。従って、放射線性マーカーでプロローブを標識することが望まれる。

最近、ビオチン-アビジン結合を用いた酵素ラベルが用いられている。アビジンは卵白中に含まれる分子量66000の超高分子量タンパク質であり、分子量244のビオチンと高い親和性を有しており、その解離定数は 10^{14}

M^{-1} という高値である。酵素による標識は、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNAプロローブを、これのハイブリダイゼーションをその低分子量の塩にあまり妨害しないビオチンで標識し、DNAプロローブを検出しようとするDNA又はRNAとハイブリダイズさせた後にアビジン-酵素結合体をアビジン-ビオチン結合を利用して結合させることによって行なわれる。

DNAをビオチンで標識するための公知の方法は、デオキシリボヌクレアーゼ及びDNAポリメラーゼの存在下でDNAを標識するヌクレオチドをビオチン結合ヌクレオチドに置換するニックトランスレーション法及びフォトリソチン(BREX法)を光照射してDNAと反応させる方法を含む。

抗原抗体反応もまたDNAプロローブを標識するために用いられる。この方法では、DNAを先ずビオチン、フルオレセイン又はN-アセチルチン-2-アセチルアミノフルオレン等のハプテンで標識し、検出しようとするDNA又はRNAとハイブリダイズさせた後、標識又は非標識で標識した、DNAプロローブに結合されたハプテンに対して特異的な抗体をDNAプロローブ上のハプテンと結合させて検出しようとするDNA又はRNAを検出する。

化学的に合成されたものを除き、従来のDNAプロローブのほとんどは二重鎖である。従って、DNAプロローブを検出しようとするDNA又はRNAとハイブリ

ダイズする前に、アルカリ処理又は熱処理によってDNAプロローブを一末端に変性させなければならない。さらに、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA自身が標識されるので、相違性が低下し、その結果ハイブリダイゼーションが妨げられて検出感度が低下する。特に、DNAプロローブが標識のような高分子量物質によって直接標識される場合には、ハイブリダイゼーションが著しく妨害される。

さらに、検出しようとするDNA又はRNAとは異なる形態のDNA又はRNAがしばしば被検試料中に混入する。ベクターを用いて製造されたDNAがDNAプロローブとして用いられる場合には、ベクター由来のDNA領域は通常十分には除去されていない。従って、被検試料にベクターと同一形態のDNA又はRNAが混入していると、その混入DNA又はRNAが偽陽性として検出される。

発明の開示

従って、この発明の目的は、検出感度が高く、取扱いが安全であり、簡単に使用することができるDNAプロローブを提供することである。

この発明のこの目的及び他の目的は、検出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片と、放射線性マーカー又は非放射線性マーカーを結合することが可能な官能基を有する二重鎖DNA断片を含むDNAプロローブを提供することによって達成される。

この発明によると、検出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションに因りしない二重鎖領域が形成されるので、検出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片は完全の状態であり、ハイブリダイゼーションが標識によって全く妨害されず、従って検出感度が高い。さらに、検出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションに供されるDNA断片以外の領域は二重鎖であり、DNA又はRNAともハイブリダイズしないので、DNAプローブの二重鎖領域と同一起源のDNA又はRNAが被検試料中に混入していても、その混入物はDNAプローブとハイブリダイズしないので偽陽性がもたらされない。この発明のDNAプローブは検出しようとするDNA又はRNAに相補的な領域は単鎖であるので、使用時にプローブを安定させる必要がなく、従って簡単に使用できる。この発明のDNAプローブは放射性標識を利用しないので、プローブの取扱いが安全であり特殊な設備を必要としない。この発明のDNAプローブが、非放射性マーカーを結合することができると、官能基を有する場合に、DNAプローブは標識で直接標識することができ、これは単に便利だけでなく、それぞれ異なるマーカーで標識されたこの発明のDNAプローブの混合物を用いることによって未知のDNA又はRNAを特定することも可能になる。

図面の簡単な説明

図、ポリリヌス酸、ブルセラ菌、赤痢菌、肺炎ビブリオ菌、ペスト菌、大腸菌、カンピロバクターのような細菌；カンジダのような酵母；プラスモディウム；梅毒トレポネマのようなスピロヘータ；並びに細菌細胞及びがん細胞のような動物細胞を含む。検出しようとするDNA又はRNAは全塩基配列を有していてもよいその一部であってもよく、また単鎖でも二重鎖でもよい。

DNA又はRNAに相補的なDNA断片は通常、検出しようとするDNA又はRNAと同一の起源に由来する。もっとも、供給菌ウイルス、細菌、原生動物は動物細胞から検出したもの；供給菌からのDNA又はRNAをベクターに挿入し、このベクターを宿主中で複製する遺伝子工学によって産生されたもの；及びDNA又はRNAの塩基配列が知られている場合には化学的に合成されたものを包含するあらゆるDNA又はRNAを用いることができる。

この発明のDNAプローブに用いることができる非放射性マーカーは蛍光物質、化学発光物質及び酵素を包含し、さらに、ヒオキシン及びN-アセチルヒオキシンアセチルアミノグルコシドのような低分子物質を結合することができる物質。これらの低分子物質をアプテンとする抗体、上記低分子物質を結合することができるアプテンのような高分子物質及びマーカーと上記物質の複合体をも包含する。蛍光物質の非限定的な例としてフルオレ

第1図はこの発明のDNAプローブの製造方法を説明するための概略図。

第2図はこの発明のDNAプローブの他の製造方法を説明するための概略図である。

発明を実施するための最良の形態

上述したように、この発明のDNAプローブは、検出しようとするDNA又はRNAに相補的な領域部分を有する。この発明のDNAプローブによって検出しようとするDNA又はRNAの起源は、例えば、肺炎(AE、B型)ウイルス、A119ウイルス(HTLV-III)、ATLVウイルス(HTLV-III)、単純ヘルペス(1型、2型)、サイトメガロウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、インフルエンザウイルス、巨大細胞ウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、マールブルグ病ウイルス、アズノウイルス、デングウイルス、B型肝炎ウイルス、マumpsウイルス、ワクチニアウイルス、バルボウイルス、パポウイルス、ロタウイルス、タナポックスウイルス、ヤバウイルス、ラッサ熱ウイルス、タバコモザイクウイルスのようなウイルス；マイコプラズマ；ツググンシリゲッタ、Q熱リゲッタ、炭疽毒素リゲッタのようなリゲッタ；クラミジアトラコモマティス、クラミジアブシクシス；リン菌、破傷風菌、炭疽芽球菌、レンサ球菌、結核菌、肺炎菌、炭疽菌、肺炎球菌、サルモネラ菌、コレラ菌、チフス菌、パラチフス

セイン及びロダミンを挙げることができる。化学発光物質の非限定的な例としてルミノール、イソルミノール、R-(4'-アミノブチル)-R-エチルイソルミノール、R-(4'-アミノヘキシル)-R-エチルイソルミノール、R-(4'-アミノブチル)-R-エチルイソルミノールヘキサクシアンミド、ロフィン、ルシグニン、アクリリウムエステル、ピロガロール、ルシフェリン、インドール、リポラビン、2-メチル-6-フェニル、7-ジヒドロイミダゾ(1,2-a)-ピラジン-3-オン及びその誘導体を挙げることができる。酵素の非限定的な例としてペルオキシダーゼ、β-ガラクトシダーゼ、アルカリファスファターゼ及びアシッドファスファターゼを挙げることができる。

DNAを高分子マーカーで直接標識することもできるが、DNAをヒオキシンのような低分子マーカーで標識し、次いで酵素又は蛍光物質のようなマーカーが結合される。上記低分子物質に特異的に結合する高分子物質を結合させることもできる。また、DNAをアプテンで標識し、次いでそのアプテンに対して特異的な抗体と酵素との複合体又は抗体を蛍光標識したものを結合させることができる。

非放射性標識を結合することができると、官能基は公知であり、非限定的な例としてアミノ基、カルボキシル基、メルカプト基、水酸基、エポキシ基及びホルミル基を挙げることができる。DNAがこのような官能基を有する場合

には、それを断片で直接標識することができる。このような基をDNAに導入する方法は例えば欧州特許第63,678号又は“Nucleic Acid Research” 1 (5), p.1533 (1981)に記載されている。なお、この発明のDNAグループがこのような官能基を有する場合には、非放射性マーカーはこのような官能基に結合されるべきである。非放射性標識の官能基への結合は放出しようとするDNA又はRNAとのハイブリダイゼーションの前又は後に行うことができる。

この発明のDNAグループの二重鎖領域は、非放射性マーカーで標識することができ、又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有し、かつ放出しようとするDNA又はRNAに相補的な単鎖DNAを連結することができ、いずれのDNAであってもよく、例えばベクターDNA又は合成DNAである。これらのうち、 ϕ X-174、S13、M12、 ϕ 1、 ϕ 4及びM13のような、単鎖環状DNAを有するバクテリオファージに由来するものが好ましい。

この発明のDNAグループの大きさは重要ではない。12塩基ないし数十塩基と広範囲にわたる。

この発明のDNAグループは2つの基本的な方法により調製することができる。第1の方法では、放出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片を含む第1の単鎖DNAを、該第1の単鎖DNA中の放出しようとするDNA又はRNAに相補的な断片以外の領域に対して

と複製型と呼ばれる二重鎖環状DNAが先ず形成され、次いでこの二重鎖環状DNAを鋳型として用いて単鎖環状DNAが形成され、このようにして形成された単鎖環状DNAが次にファージの形態で細胞から放出される。第1の方法の好ましい具体例ではこのようなファージが用いられる。先ず、ファージが感染している宿主細胞からファージの二重鎖環状DNAを抽出し、これを細胞培養で切断して解離する。上記細胞培養と併し細胞培養で切断された、放出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な二重鎖DNAを上記解離されたDNAと連続して、放出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片を挿入された二重鎖環状DNA (第1図中、参照番号10で示す)を形成する。次のようにして得られた二重鎖DNAを宿主細胞にトランスフェクションさせる。二重鎖環状DNAは宿主細胞中で複製され、放出しようとするDNA又はRNAに対して相補的なDNA断片を含む第1の単鎖環状DNA12がファージの形態で宿主細胞から放出される。

一方、同じファージから誘導された二重鎖DNA (DNAは複製型、産生型又はニックトランスレクション等により目片化されていてもよい)を非放射性マーカー15でラベルし、次いでこれを産生し、前記第1の単鎖DNAの、放出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の領域に相補的な第2の単鎖DNA18を形成する。この発明のDNAグループ

の相補的な断片を含む第2の単鎖DNAとハイブリダイズさせる。第2の単鎖DNAは非放射性マーカー又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有する。第2の方法では、放出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片を含む第1の単鎖DNAを提供し、次いでこの第1の単鎖DNAを鋳型として用い、非放射性マーカー又は非放射性マーカーを結合することができる官能基を有するヌクレオチドを用いて、放出しようとするDNA又はRNAに対して相補的な単鎖DNA断片以外の前記第1の単鎖DNAの領域上に相補DNA鎖(以下第2のDNAという)を形成する。これらの2つの方法において、非放射性マーカーを結合することができる官能基が用いられる場合には、非放射性マーカーは二重鎖DNAが形成された後に結合することができる。

上記2つの方法を、断片の位置を管理しながらその好ましい具体例に基づいて詳細に説明する。

バクテリオファージ (以下ファージという)を用いた第1の方法の好ましい具体例を第1図に基づいて説明する。

ファージ、すなわち、その宿主が細菌又は放線菌であるウイルスは古くから知られている。ファージのうち、 ϕ X-174、S13、M12、 ϕ 1、 ϕ 4及びM13は単鎖環状DNAを有するものとして知られている。このようなファージのDNAが宿主細胞内に取り込まれる

は第2図の第1の単鎖DNA12と第2の単鎖DNA18とをハイブリダイズすることによって得ることができる。

なお、非放射性マーカーを結合することができる官能基は二重鎖DNA14又は単鎖DNA18に導入することができる。非放射性マーカーを官能基に結合することができる。

この発明のDNAグループを調製するための上述した第2の方法においては、第2のDNAを、放出しようとするDNA又はRNAに相補的なDNA断片以外の第1の単鎖DNA領域上に、第1の単鎖DNAの上記領域を鋳型として用いて形成する。これは、好ましくは10ないし20塩基、さらに好ましくは15ないし17塩基の合成DNA (プライマー)を、第1の単鎖DNAの二重鎖DNAにしようとする領域の3'末端部分とハイブリダイズさせ、ピロチン、ハプトン、無定形質、化学的充満質のような非放射性マーカーを結合することができる4UTP及びdATPのようなヌクレオチド及び4種のアミノ酸、すなわち、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPの存在でDNAポリメラーゼのクローナリングメントを用いて上記プライマーを伸張することによって行うことができる。第2のDNAが完全に形成されたか否かは、別に調製した標準DNAを対照として用いた電気泳動によって確認することができる。第2のDNAの形成が1つのプライマーを用いて完了することができない場合に

は 2 又は 3 以上のプライマーを第 1 の単鎖 DNA とハイブリダイズさせることができる。

第 2 の方が好ましい具体例を第 2 図に基づいて説明する。検出しようとする DNA 又は RNA に相補的な断片を含む第 1 の単鎖 DNA は、例えば第 1 の方法と同様に得ることができる。合成 DNA 2 4 を最初の相補鎖位 (第 2 図では EcoRI 部位) にハイブリダイズさせ、少なくとも 1 つの合成 DNA 2 2 をプライマーとして第 1 の単鎖 DNA の対応する部分にハイブリダイズさせる。言うまでもなく、プライマーをハイブリダイズさせる第 1 の単鎖 DNA の部分は、検出しようとする DNA 又は RNA に相補的な断片以外の領域である。次に DNA を上記制限酵素で切断する。DNA グループが固定で用いられる場合には、第 2 の鎖の伸長を終端させるストッパーを、合成 DNA 1 2 に対して相補鎖位に置かなければならない。次に、アミノ基の導入のためにアルミニウムが結合した dUTP 並びに dATP、dCTP、dGTP 及び dTTP の存在下で DNA ポリメラーゼを用いてプライマー 2 2 を伸長する。このようにして形成された第 2 の DNA にビオチン結合するためにカプロイルアミドビオチン-N-セトリンキシクシリンジメチルエステルを DNA 1 2 と反応させることで鎖状のこの発明の DNA グループを得ることができる。

この発明の DNA グループは、鎖状又は環状の形態で用いることができる。この発明の DNA グループは

A を開示した。

2. ビオチン鎖状 M13ap15 RF DNA の調製

米国メリーランド州 20817 ガイアスバークの BRL 社から市販されているニクトランスレーション試薬の母液 A 4 (4.0 ± 0.2 mM の dATP、dCTP 及び dGTP) 5 ml、2 µl の M13ap15 RF DNA 母液 (0.5 µg/µl、日本京都府の空知建設株式会社から市販)、2.5 µl の 3.4 mM ビオチン-11-dUTP 及び 2.5 µl の母液 B (H₂O) を混合した。次いで 5 µl の母液 C (0.4 U/µl の BRL DNA ポリメラーゼ、45 ng/ml のデオキシリボヌクレアゼ) を混合液に加え、この混合物を 15 分で 1.5 時間インキュベートした。この反応混合物中に 5 µl の母液 D (500 mM EDTA) 及び 1.25 µl の 1% SDS 水溶液を加えた。この混合物を 5 ml のセフダックス 50 カラムに架け、1 × SSC (0.15 M NaCl、15 mM クエン酸ナトリウム、pH7.0) で洗浄し、脱出液を 150 µl づつ分取した。各分取をニトロセロースろ紙上に 2 µl づつスポットし、80 °C で 30 分間加熱した。ろ紙をラッキング緩衝液 (45 mM、0.05% Triton X-100、及び 5 mM の EDTA を含む PBS (0.15 M NaCl、3 mM Na₂HPO₄、3 mM NaH₂PO₄)) 中に置換して 30 分間浸漬した。次にろ紙を、再洗滌液で 2.0 0 倍に再洗された。メンゾ社 (ニューヨーク州スローク・ハドソンストリート 3 2 5) から市販されているアビシンとアシドブラスファクターとの結合体である検出抗体「Pete X-1-agg」の溶液中に置換して 1 時間浸漬した。

従来の DNA グループと同様に用いることができる。すなわち、調べようとするウイルス又は微生物を含むことが要われる組織、体液等の検体試料又は植物組織の抽出液はガン細胞の検体試料をガラス板に固定する。あるいは、組織、体液又は細胞から抽出された DNA 又は RNA をニトロセロース又はナイロンのろ紙膜上に固定する。次いでガラス板又はろ紙膜を、予め組織に染色させた。検出しようとする DNA 又は RNA と共にインキュベートする。DNA グループが放射線性マーカーを結合することがある官能基を有し、放射線性マーカーを含まない場合には、放射線性マーカーをハイブリダイゼーション後に官能基に結合してハイブリダイズしたグループを検出する。それぞれの使用において洗滌工程が通常行なわれる。

この発明は以下の実施例を参照することによってより良く理解されるであろう。実施例は例示のためにのみ示されたものであって、これらを用いる場合も限定的に解釈してはならない。

実施例 1

1. アデノウイルス 2 (Ad2) DNA が導入された M13ap15 単鎖 DNA の調製

1984 年 1 月 1 日にアマシム・ワパンによって発行された「M13 ファージによるクロニングとビデオキシングシステム」に記載された方法に従い、5.2 kb の Ad2 DNA の HindIII 断片が導入された単鎖 M13ap15 DNA

ろ紙を次に洗滌緩衝液 (0.5 M NaCl、0.5% Triton X-100、1 mM EDTA、1% SDS) 及び 10 mM SPG、pH8.3) で 5 分間づつ 5 回洗い、予備洗出緩衝液 (0.2 M 酢酸ナトリウム、pH5.8) で 2 分間づつ 2 回洗った。ろ紙を次に、1 mM のナトリウム AS-XE フォスファートの予備洗出緩衝液と 4ng/ml のファーストバイオレット B 染色の予備洗出緩衝液の 100:1 混合液である溶液中で連続して 1.5 時間インキュベートした。着色した断片を 1 つにまとめ、約 1 µg/ml のビオチン鎖状 M13ap15 RF DNA を得た。

3. DNA グループ形成 (ハイブリダイゼーション) の調製

Ad2 DNA が導入された 300 ng/ml の M13ap15、5 分間浸漬することによって変化した、300 ng/ml のビオチン鎖状 M13ap15 RF DNA、50% ホルムアミド、4 × SSC (0.72 M NaCl、40 mM NaPO₄、4 mM EDTA、pH7.4)、5 × デンハルツの緩衝液 (0.1% ポリビニルピロリジン 390、0.1% コール 400、0.1% SDS)、0.1% SDS、0.1 ng/ml 免疫サグ抗体 DNA 及び 10% 濃縮デキストランを 4.2 分で 1.5 時間インキュベートした。

4. Ad2 DNA の検出及び定量

濃度が 1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml、1 ng/ml 又は 0.1 ng/ml の Ad2 DNA (BRL 社から購入) 溶液 5 µl をニトロセロースろ紙上にスポットし、ろ紙を 80 °C で 1 時間加熱した。ろ紙を生理食塩水中で 1.5 分間浸漬し急速に乾燥し、予備ハイブリダイゼーション

庫 (90Sホルムアミド、4 × SSPE、5 × デンハルトの溶液、0.1% SDS及び0.1 mg/mlの炭性サケ精子DNA)中に浸漬し、42℃で3時間インキュベートした。ろ紙を洗いに、先に調製したハイブリダイゼーション溶液中で42℃で10時間インキュベートし、0.1% SDSを含む2 × SSCで強洗で15分間洗い、同じ溶液で60℃で15分間、2回洗い、80℃を含む2 × SSCで強洗で1回洗い、予熱検出溶液中に浸漬した。ろ紙上のスポットはビオチン標識H13ap15 RF DNAの調製の場合と同様に着色され、10 ng/ml以上のA62 DNAが検出された。

実施例2

1. A62 DNAが挿入されたH13ap15 単鎖DNAの調製
A62 DNAが挿入されたH13ap15 単鎖DNAを実施例1と同様にして調製した。

2. ビオチン標識H13ap15 RF DNAの調製

BRESA社 (502), サクソーオーストラリア、アダワイド)により市販されているフォージビオチン標識 (log/ml) 2 × 1、及び10 × 1のPBSをヘマトクリット管に注出した。管の両端を封止した後、管を氷水中に入れキセノンランプで照射した。反応混合物を5 mlのセファダックスG-50カラムに架け、0.1% SDSを含む1 × SSC 溶液で溶離した。溶離した液は150 µlずつ分注した。各部分について実施例1と同様にして着色試験を行ない、着色した部分を1つにまとめて約1 µg/mlのビオチン標識H13ap15 RF DNAの調製を得た。

キュベートした、100 µlの緩衝液 (67 mM KPO₄、及び9.7 mM MgCl₂、pH7.4)、アルファミン-4UTP (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78, No. 11, pp. 6833-6837, 1981年11月の記載に従って調製)の1 mM溶液を10 µl 及び30 µlのDNAポリメラーゼIラジラジメント (4.2単位/µl)を混合液に加え、これを25℃で30分間インキュベートした。フェノール抽出後、適正に二本鎖化されたDNAがエタノール沈澱によって得られた。

2) ビオチンによる標識

1) で得られたDNAを100 µlの0.1 M NaECG₃に溶解し、これに20 µlの4-カルボキシアルブミドビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (BRL社から市販)の250溶液 (1mg/ml)を加え、この混合物を強洗で10分間反応させた。反応混合物を3 mlのセファダックスG-50カラムに架け、1 × SSC (0.1% 塩化ナトリウム及び0.01% キュエン酸ナトリウム)で溶離し、DNAを含む部分を回収した。

3. HSV DNAの検出及び定量

500 ng/mlのビオチン標識DNAプローブを金目ハイブリダイゼーション反応を実施例1と同様にして調製した。HSV DNAがその上でクロウニングされているpBR322ベクターを開鎖酵素Sph Iで切断し、濃度1000 ng/ml、100 ng/ml、10 ng/ml及び1 ng/mlの上記濃度を5 µl ずつエチルアルコール系ろ紙上にスポットした。

3. DNAプローブ標識 (ハイブリダイゼーション反応)の調製

ビオチン標識H13ap15 RF DNAを超音波破砕液 (高上電 4200) で1 Aで30分間処理した以外は実施例1と同様にしてDNAプローブ標識を調製した。

4. A62 DNAの検出及び定量

検出及び定量を実施例1と同様にして行ない、10 ng/ml以上の濃度のスポットを検出した。

実施例3

1. B型肺炎ウイルス (BSPV) DNAが挿入されたH13ap15 単鎖DNA (H13ap15)の調製

実施例1と同じ方法により、1.4 kbのBspHI断片が挿入されたH13ap15を得た。

2. ビオチン標識DNAプローブの調製

1) H13ap15上のDNAの形成

B型肺炎ウイルスの合成オリゴDNA、すなわち、H13ap15のEcoRI 部位に特異的な合成オリゴDNAと、H13ap15のM13複製の等距離の4つの領域にそれぞれ特異的な合成オリゴDNAとをそれぞれ1 µg ずつ含む水溶液 (100 µl)を、T₇エヌレックス (10 mM Tris-HCl) 及び1 mM EDTA pH8.0)中H13ap15 (0.5 µg/µl) 40 µlと混合し、この混合物を55℃で5分間インキュベートした。次にK₂Cl₂、及びNaClをそれぞれ7 mM及び100 mMの最終濃度になるように加えた。制限酵素EcoRI 溶液 (2 単位/µl) 3 µlを加え、この混合物を37℃で3時間イン

pBR322中に挿入されたHSV DNAの検出及び定量的結果、10 ng/ml以上の濃度のスポットが陽性であった。

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/JP 84/00642 (84 19478)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The numbers in parentheses contained in the European Patent Office EPO file as JP/84/87.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0182148	27/09/84	AN-A- 81224684	28/08/85
		JP-A- 61181899	28/08/85
EP-A- 0133571	06/03/83	AN-A- 5138784	07/02/83
		JP-A- 60100554	09/04/85
EP-A- 0187468	15/07/85	JP-A- 60144862	31/07/85
		AN-A- 3481384	20/08/85
EP-A- 0178153	19/07/86	AN-A- 8248880	25/11/85
		JP-A- 83003888	07/01/86
EP-A- 0123873	04/09/85	JP-A- 60204997	21/10/85

For more details about this annex
see Official Journal of the European Patent Office, No. 18/88